

Untersuchung der Reaktionen von Tabak auf Trockenstress

Julia Broska
Im Sempel 6
55246 Mainz-Kostheim

Goethe-Gymnasium, Frankfurt a.M.

Diese Arbeit wurde während eines Schüler-Praktikums vom 16.08.-10.09.2004 erstellt.
Das Praktikum wurde vom Förderverein der Biologieolympiade e.V. organisiert.

Inhalt

Untersuchung der Reaktionen von Tabak auf Trockenstress	1
Inhalt	2
1. Aufgabenstellung	3
2. Methoden	4
2.1. Messung der Chlorophyllfluoreszenz	4
2.2. Extraktion, Derivatisierung der polaren bzw. lipiden Metabolite und GCMS.....	5
3. Durchführung	8
3.1. Säen, Pikieren, Topfen	8
3.2. Trockenstress und Chlorophyllfluoreszenz	9
3.2.1. Ermittlung des Wasserbedarfs	9
3.2.2. Ermittlung des Wasserverlusts	9
3.2.3. Messung der Chlorophyllfluoreszenz	10
3.3. Phänotypische Beschreibung und Ernte.....	11
3.4. Extraktion, Derivatisierung und GCMS-Metabolitenprofil	11
3.4.1. Extraction (first day)	11
3.4.2. Derivatisation (second day)	13
3.4.3. Measurement (second day)	14

1. Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Reaktionen von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Linie SNN) auf Trockenstress. Pro Experiment wurden dazu 12 (10) Pflanzen herangezogen. Einen Monat nach Aussaat wurden die Setzlinge pikiert und in Split-root-Töpfe gesetzt. Nach 3 (vor der Blüte) bzw. 3,5 Monaten wurden die Pflanzen Trockenstressperioden unterschiedlicher Dauer ausgesetzt. Während des Trockenstresses wurden sowohl an den gestressten, als auch an den Vergleichs (Referenz)-Pflanzen Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen durchgeführt. Dies ermöglicht einen Vergleich der Photosyntheseleistungen der einzelnen Pflanzen miteinander.

Am Ende der Trockenstressperiode wurden phänotypische Merkmale aller Pflanzen katalogisiert. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Pflanze mit anschließender Ermittlung von Spross- und Wurzelgewicht.

Bei der Ernte werden Proben von verschiedenen Pflanzenorganen genommen (Wurzel, Blatt und Knospe bzw. Blüte). Aus diesen Proben werden Metabolite extrahiert, der Extrakt wird derivatisiert und dann mit GCMS vermessen. So können neben den phänotypischen Erscheinungen Reaktionen des Stoffwechsels auf den Trockenstress untersucht werden.

2. Methoden

2.1. Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Mit der Chlorophyllfluoreszenz-Messung kann die Photosyntheserate von Pflanzen gemessen werden. Im vorliegenden Experiment wurde mit dem Portable Chlorophyll Fluorometer PAM-2000 gemessen. Um den Mechanismus der Chlorophyllfluoreszenz-Messung zu verstehen, ist zunächst ein Blick auf den Ablauf der Photosynthese notwendig. Werden Elektronen in den Chloroplasten mit kurzwelligem Licht angeregt, so haben sie beim Zurückfallen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zwei Möglichkeiten: Entweder, sie fallen nicht ganz zurück und folgen dem Potentialgefälle der Photosynthese und finden damit ihre Verwendung in der Energiegewinnung, oder sie kehren auf ihr ursprüngliches Niveau zurück und senden dabei langwellige Strahlung aus, die sogenannte Fluoreszenz. Betreibt eine Pflanze viel Photosynthese, so bleiben nur wenige Elektronen für die Fluoreszenz übrig, man spricht von photosynthetischer Fluoreszenzlöschung.

Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, wie eine Messung vorgenommen werden kann.

Zur Messung der photosynthetischen Induktion ist ein vorheriger ca. 15 min Dunkelabgleich notwendig, d.h. die Pflanze muss sich zu Beginn der Messung im dunkeladaptierten Zustand befinden. Durch die Dunkeladaption kann in den ersten ca. 2 sec nach Lichtinduktion keine Photosynthese ausgeführt werden. Der Veränderungsverlauf der Fluoreszenzstärke wird gemessen, bis sie einen konstanten Wert erreicht. So kann man die Grund- oder Dunkelfluoreszenz F_0 messen sowie die maximale Fluoreszenz F_m . Alle angeregten Elektronen gehen somit den Fluoreszenzweg. Nach etwa 4 Minuten geht dann die Fluoreszenz auf einen konstanten Endwert F_t ($t = \text{terminal}$) zurück.

Bei der Sättigungspuls-Methode ist kein Dunkelabgleich notwendig. Der ausgesendete 1-2 sec dauernde Lichtstrahl ist so stark, dass alle Elektronen von P680 auf Q_a übertragen werden. Q_a liegt infolge dessen vollständig reduziert vor - der Lichtblitz „sättigt“ das Q_a . Dadurch entsteht dann die maximale Fluoreszenz F_m , denn für die nachfolgenden Elektronen ist der Weg der Photosynthese versperrt. Da die Pflanze nicht dunkeladaptiert ist, entsprechen sich bei dieser Methode F_t und F_0 . Yield ist dabei das Maß für die Photosyntheseaktivität der Pflanze im Grundzustand, natürlich auf die Lichtintensität bezogen. Sie ergibt sich aus der Differenz zwischen Grundfluoreszenz und maximaler Fluoreszenz, wobei der Wert nochmals mit F_m abgeglichen wird (Werte sollen vergleichbar werden).

$$\text{Yield} = \frac{F_m' - F_0'}{F_m'}$$

ETR (Elektronen-Transport-Rate) ist ein Maß für die wandernden Elektronen. Sie ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{ETR} = \text{Faktor} * \text{Yield} * \text{Lichtintensität}$$

Die Grundfluoreszenz kann sich unter dem Einfluss bestimmter Umweltbedingungen verschieben und Trockenstress ist eine davon.

2.2. Extraktion, Derivatisierung der polaren bzw. lipiden Metabolite und GCMS

Bei der Extraktion wird das gefrorene Pflanzenmaterial in verschiedenen Lösemitteln inkubiert. Ziel ist es, polare und lipide Metabolite herauszulösen, in zwei Phasen aufzutrennen und für die GCMS-Messung aufzubereiten.

Methanol ist ein polares Lösungsmittel, das Proteine und Enzyme inaktivieren kann, so dass nach der Methanol-Zugabe Veränderungen der Metaboliten auch bei Raumtemperatur minimiert werden.

Das zugegebene Chloroform ist ein lipophiles Lösungsmittel. Es löst unpolare Stoffe aus dem Pflanzenmaterial heraus.

Die Zugabe von Wasser hat die Trennung des Gemisches in polare und lipide Phase zur Folge.

Dem Extrakt werden folgende Standards zugegeben:

Nonadecanoic acid methylester ist lipophil. Ist dieser Stoff in den Aliquots der polaren Phase nachweisbar, wurden die Phasen nicht richtig getrennt.

Ribitol ist ein polarer Standard und sollte in jedem polaren Metabolitenprofil vorhanden sein.

D4-alanin (deuteriertes Alanin) dient der Quantifizierung von Alanin in der Pflanze.

D-(-)-isoascorbic acid wird leicht oxidiert und kann somit als Maß für den Sauerstoffeinfluss, den die Probe erlitten hat dienen.

Das anschließende Zentrifugieren sedimentiert nicht gelöstes Pflanzenmaterial.

Die aus den verschiedenen Phasen entnommenen Aliquote werden dann in der Speed Vac eingetrocknet. Die Speed Vac engt Stoffe ein, ohne sie zu erhitzen. Dazu bedient sich die

Speed Vac zweier Mechanismen. Die zu trocknenden Proben werden kreisförmig auf einer Scheibe angeordnet, die Deckel der Reaktionsgefäße werden geöffnet. Während des Trocknens rotiert diese Scheibe (ähnlich einer Zentrifuge). Durch das schräge Einsetzen der Reaktionsgefäße wird die Oberfläche der Lösung vergrößert und durch das Rotieren der Scheibe rotiert auch die Flüssigkeit an sich. Durch dieses Phänomen kann der sog. Siedeverzug verhindert werden. Die Lösung kann gleichmäßig verdampfen, ohne zu spritzen o.ä. Bei Anlegen eines Vakuums folgt das Lösemittel der allgemeinen Zustandsgleichung:

$$\frac{P \cdot V}{T} = \text{konstant}$$

Dadurch kann der Verdampfungspunkt unter Raumtemperatur gesenkt werden. Das Lösemittelgemisch wird in einem Behälter aufgefangen und nach mehreren Stunden (über Nacht) sind die Proben eingengt.

Bei der Derivatisierung entstehen durch chemische Reaktionen flüchtige Derivate, die nun mit GCMS vermessen werden können.

Durch das Methoxyaminhydrochlorid werden Carbonyl-, Carboxyl- und Ketogruppen methoxymiert (z.B. Zucker). Die in vielen Isomeren vorhandenen Zucker bilden nach der Methoxyminierung nur noch zwei Derivate. Das erleichtert die Auswertung der späteren Messergebnisse.

MSTFA ist ein Silylierungsmittel. Alle OH-Gruppen und auch andere reaktive Gruppen werden durch eine Trimethylsilyl-Gruppe ersetzt. Dadurch wird die Flüchtigkeit erhöht.

Der Alkanmix dient als Zeitstandard. An der Retentionszeit der Alkane lassen sich kleine zeitliche Verschiebungen in den einzelnen Messungen erkennen und berücksichtigen.

Nach der Derivatisierung werden die Vials in den Autosampler gestellt. Das GCMS-Gerät bedient sich, wie der Name schon sagt, der Methoden der Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Alle Proben werden, der Reihenfolge der Samplelist folgend, in das Gerät eingesetzt. In der Samplelist wurden alle Proben so geordnet, dass immer unterschiedliche Proben aufeinander folgen, um systematische Fehler zu vermeiden. Es wird 1 µl von einer Spritze entnommen und in einen erhitzten Verdampfungsraum eingespritzt. Hier wird He-Gas als Trägergas zugeführt. Dadurch wird die verdampfte Probe in die GC-Säule getrieben. Durch ein Temperaturprogramm werden die Stoffe nach Siedepunkt aufgetrennt. Die Stoffe mit der geringsten Massenzahl verdampfen im allgemeinen als erstes, die mit der höchsten zuletzt. Das GC-Gerät misst die Zeit ab der Injektion in den Verdampfungsraum.

Haben die einzelnen Komponenten die Chromatographiesäule passiert (bis eine gesamte Probe vermessen ist dauert es über eine Stunde), so werden sie direkt in das MS-Gerät geleitet, das den Zeitpunkt registriert, an dem die Stoffe aus der Säule in den Massendetektor eintreten. Dann gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es gibt z.B. Quadrupol- und TOF-Geräte. In den Quadrupol-Geräten, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, befinden sich vier Magnetstäbe. Die gasförmige Substanz wird durch einen Elektronenstrahl zerschlagen und zerfällt in verschieden große Einzelteile. Das Magnetfeld wird in kurzen Abständen so ausgerichtet, dass jeweils nur eines dieser Teile das Magnetfeld passieren kann. Die Menge des Stoffs wird gemessen, indem die Einschläge bei einer bestimmten Frequenz des Magnetfeldes gezählt werden. Später kann anhand der Einzelteile herausgelesen werden, um welchen Stoff es sich gehandelt hat. Das TOF-Gerät funktioniert ähnlich. Die Substanz wird ebenfalls zerschlagen. Dann wird jedes Teil mit der selben Energie angestoßen. Die leichtesten Teile fliegen am schnellsten, während die größeren länger brauchen. Die Flugzeit bestimmt hier also die Massenzahl. Auch hier wird die Menge der Teilchen anhand der Menge der Einschläge bestimmt. Bei beiden Methoden werden nur Einzelteilchen ab einer Massenzahl von 40 gemessen.

Durch die Verknüpfung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie entsteht für jeden Peak im Chromatogramm ein eigenes Massenspektrum. So gibt es mehrere Anhaltspunkte, anhand derer die Substanz identifiziert werden kann.

3. Durchführung

3.1. Säen, Pikieren, Topfen

Die Pflanzen werden von der Aussaat bis zur Ernte unter gleichen Kulturbedingungen gezogen. Diese sind: Relative Luftfeuchtigkeit 70%, Licht von 6-22 Uhr, Temperatur von 6-22 Uhr 22 °C, von 22-6 Uhr 18°C. Ca. 4 Wochen nach der Aussaat in Erde werden die kleinen Pflänzchen dann pikiert. Dazu müssen bereits am Tag zuvor die Töpfe für die Tabakpflänzchen vorbereitet werden. Bei 12 benötigten Pflanzen werden 14 Töpfe vorbereitet. Die Töpfe haben ein Durchmesser von 10 cm. In jeden Topf wird auf den Topfboden ein dem Durchmesser des Topfes entsprechendes Stück Filterpapier (vorher anfeuchten) gelegt, damit das feine Substrat nicht durch die Bodenöffnungen rieselt. Das zu verwendende Substrat wird abgewogen. Pro Topf werden 580g (Körnung 0,6-1,2) und 5g Levatit (Langzeitdünger) abgewogen, gut durchmischt und in den Topf eingefüllt. Es wird Sand als Substrat verwendet, damit die Wurzeln der Pflanze später einfacher vom Substrat freigewaschen werden können. Die so vorbereiteten Töpfe werden in eine Schale mit Wasser mit Fungizid (1,5 mg/l „Proplant“, Fa. Dr. Stähler) gestellt. Über Nacht saugen sie sich mit dem Wasser voll, so dass am nächsten Tag die Pflänzchen eingesetzt werden können. Das Pikieren erfolgt mit Hilfe eines Pikierstabes. Dabei handelt es sich um einen etwa 15 cm langen Holzstab mit einem abgeflachten und einem runden, spitz zulaufenden Ende. Der komplette Erdballen wird dem Topf entnommen. Dann wird der Ballen mit dem abgeflachten Ende des Pikierstabes vorsichtig entzweit. Man sucht nun 14 etwa gleichgroße Pflänzchen aus und löst sie, wieder mit Hilfe des abgeflachten Endes des Pikierstabs, aus der Erde heraus. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst viele Wurzeln der Pflänzchen unbeschädigt bleiben. Nun werden die Wurzeln in einer kleinen Schale mit Wasser von der Erde freigewaschen. In die Mitte der vorbereiteten Töpfe wird, mit Finger oder Pikierstab, ein einige cm tiefes Loch gebohrt. In dieses Loch wird das Pflänzchen gesetzt. Mit dem Pikierstab drückt man den Sand dann vorsichtig fest. Die Wurzeln der Pflanze müssen an allen Seiten fest mit Sand umgeben sein. Es werden 14 Pflanzen, pikiert.

Nach ca. 4 Wochen werden die Pflanzen dann umgetopft. Einen Tag zuvor werden 12 Vierfuß-Töpfe vorbereitet. Auf den Boden jedes Fußes wird ein zurechtgeschnittenes, angefeuchtetes Stück Glaswolle gelegt. Es soll verhindern, dass das Substrat durch die Öffnungen im Fußboden heraus rieselt, außerdem ist es durchwurzelnbar für die späteren großen Pflanzen. Es werden für jeden Fuß des Topfes 510g Sand (Körnung 0,6-1,2) und 5g Levatit abgewogen, durchmischt und eingefüllt. Auch hier wird wieder Sand verwendet,

damit die Wurzeln bei der Ernte einfacher vom Substrat freigewaschen werden können. Die Töpfe werden dann in Wasser mit Fungizid (1,5 mg/l „Proplant“, Fa. Dr. Stähler) gestellt, damit sich das Substrat über Nacht voll saugen kann. Am darauffolgenden Tag können die Pflanzen aus den 10er Töpfen dann umgepflanzt werden. Dazu wird eine große Schüssel in ein Waschbecken gestellt. Es werden von den 14 pikierten die 12 kräftigsten Pflänzchen ausgewählt. Jeder 10er Topf wird über der Schüssel vorsichtig in die linke Hand entleert. Das Pflänzchen wird zwischen zwei Finger gelegt, so dass es unbeschädigt bleibt. Das Filterpapier wird vom Boden genommen und der Sand wird unter fließendem Wasser in die Schüssel gespült. Die Wurzeln der Pflanze werden so weit wie möglich vom anhaftenden Substrat befreit (ebenfalls unter fließendem Wasser). Das Wasser in der Schüssel wird in das Waschbecken entleert und der Sand wird separat in einem Müllbeutel gesammelt. So kann einem Verstopfen der Wasserleitung vorgebeugt werden. Die Wurzeln der Pflanze werden im nächsten Schritt vorsichtig geteilt. Es wird darauf geachtet, dass möglichst vier gleich große Wurzelteile entstehen. Es wird mit größter Vorsicht gearbeitet, denn die Wurzeln des Tabaks brechen leicht. In das Substrat jedes Fußes wurde bereits ein Loch am Zentrum des Topfes gebohrt (Finger oder Pikierstab verwenden). Jeder Wurzelteil der Pflanze wird nun in eines der vier Löcher gesetzt. Dabei sollten die Wurzeln möglichst senkrecht eingeführt werden und nicht umgebogen werden. Das Substrat wird so festgedrückt, dass es die Wurzeln gut umschließt. Die kleine Pflanze sitzt nun exakt im Zentrum des Topfes und ihre Wurzeln können sich in jedem Fuß gleichmäßig entwickeln.

3.2. Trockenstress und Chlorophyllfluoreszenz

3.2.1. Ermittlung des Wasserbedarfs

Nach 1 oder 1 ½ Monaten werden die 12 Pflanzen in zwei Gruppen zu je sechs (fünf) Pflanzen geteilt. Die Pflanzen 1-6 (1-5) werden in separate Wasserschalen gestellt. Sie werden in den folgenden 3, 7 oder 14 Tagen täglich zur selben Zeit zuerst mit Wasserschale gewogen, dann gegossen (Sowohl in die Wasserschale hinein als auch auf die Blätter. Vorsicht! Nicht die Blätter der Nachbarpflanzen im Trockenstress benetzen!) und ein weiteres Mal mit Wasserschale gewogen. Dadurch kann bei der späteren Versuchsauswertung der Wasserverbrauch der Pflanzen berechnet werden.

3.2.2. Ermittlung des Wasserverlusts

Die Pflanzen 7-12 (6-10) werden in eine trockene Wanne gestellt und nun gar nicht mehr gegossen. Auch die Blätter sollten nicht benetzt werden. Die Pflanzen im Trockenstress

werden ebenfalls täglich zur etwa selben Uhrzeit gewogen, damit später der Wasserverlust bestimmt werden kann.

3.2.3. Messung der Chlorophyllfluoreszenz

In der vorliegenden Arbeit wurde das Portable Chlorophyll Fluorometer PAM-2000 verwendet. Man geht folgendermaßen vor: PAM und angeschlossener Computer werden angeschaltet. Der Computer erfasst die Daten mit dem Programm PAMWin. Im vorliegenden Experiment wurde nur mit der Sättigungspuls-Methode gearbeitet.

Zuerst wird das Gerät auf eine bestimmte Lichtintensität eingestellt. Da die Photosyntheserate stark von der Lichtintensität abhängt, ist es notwendig, dass die zu Beginn gewählte Intensität nun nicht mehr geändert wird. Die Lichtintensität wurde auf etwa 40 PAR (Photosynthetic Aktiv Radiation) eingestellt (300 bei entfernter Lichtimpulsfaser, da die Faser nun die Lichtsensoren nicht mehr beschattet). Beide Werte müssen stets konstant bleiben. Wichtig bei allen Messungen ist, dass sie bei etwa gleichbleibender Temperatur durchgeführt werden. Die Temperatur hat nämlich einen erheblichen Einfluss auf das Verhältnis von Photosyntheseaktivität und Fluoreszenz. Die Temperatur wird von PAMWin ebenfalls gemessen und im Report angezeigt. Ist alles eingestellt, wählt man in PAMWin die Funktion „Report“. Alle gemessenen Daten werden hier aufgelistet. Als nächstes wird ein Pflanzenblatt eingespannt (das Blatt darf dabei nicht beschädigt werden, da die späteren Versuchsergebnisse nicht auf eine durch mechanische Verletzungen gestresste Pflanze zurück gehen sollen). Es wurde je Pflanze ein Blatt von oben, aus der Mitte und von unten vermessen, wobei pro Blatt einmal an der Blattbasis und einmal an der Spitze gemessen wurde. Um den Versuch replizierbar und nachvollziehbar zu gestalten, wurde die Abfolge des vermessenen Blattes, von der Pflanzenspitze an herab gezählt, notiert. Es wurden gleich viele Trockenstress- und Referenz-Pflanzen vermessen, damit die Daten miteinander verglichen werden können. Nun wird in PAMWin die Funktion „SAT-Pulse“ ausgewählt. Es erfolgt eine 1-2 sec kurze, punktuelle Beleuchtung durch die Lichtimpulsfaser und im Report-Fenster erscheinen die Messdaten. Die Messung wurde immer zur etwa gleichen Tageszeit vorgenommen.

Im vorliegenden Versuch wurden nach 7 und nach 8 Tagen Trockenstress Chlorophyllmessungen an 6 bzw. 8 Pflanzen durchgeführt.

3.3. Phänotypische Beschreibung und Ernte

Nach 9 Tagen Austrocknung wurden die Pflanzen einer phänotypischen Beschreibung unterzogen. Räumliche Ausdehnungen wurde mit einem Lineal gemessen.

- Sprosshöhe (cm);
- Sprossdurchmesser oben und unten (cm);
- Blattanzahl gesamt; davon braune, gelbe, grüne und kleine Blätter;
- Blattgröße – Länge und größte Breite von je einem Blatt oben, aus der Mitte und unten (cm);
- Knospenzahl geschlossen und Blüten

Zur Ernte werden die Pflanzen direkt über dem Wurzelansatz abgeschnitten, die Knospen und Blüten der Pflanze werden vom Spross getrennt. Der Wurzelansatz wird mit einem Skalpell geviertelt, so dass alle Wurzeln eines Topffußes einem Viertel entspringen. Es wird eine kleine Plastikschaale in ein Waschbecken gestellt. Über diese Schale kippt man nun je einen Fuß des Split-Root-Topfes aus. Zuerst wird die Glaswolle entnommen. Nun lässt man in die Schale Wasser fließen. Die Wurzel löst sich nun sehr leicht aus dem Substrat. Die Wurzel wird ausgewaschen und abgetupft. Das Wasser in der Schale wird in den Abguss gekippt, der Sand wird in einen Müllsack entsorgt. Wurzeln, die die Glaswolle durchwurzelt haben, werden zusammengefasst. Sie werden im Folgenden als Restwurzeln bezeichnet.

Gewogen wurden folgende Pflanzenorgane:

- Blüte
- Spross und Blätter
- Split-roots 1-4
- Restwurzeln

3.4. Extraktion, Derivatisierung und GCMS-Metabolitenprofil

Extraktion, Derivatisierung und Messung werden nach Serviceprotokoll durchgeführt.

3.4.1. Extraction (first day)

- 1) Sample plant material in **2ml Eppendorf tube** (round bottom-shaped). Define the exact mass of plant sample (*should be 57-64 mg fresh weight for leafs or roots, ~30mg*)

fresh weight for potato tubers or fruits, document the fresh weight of each sample).

Shock-freeze sample in liquid N₂. Shock-freezing is best done before determination of sample mass.

- 2) Homogenize with a **Retsch ball mill, 3 min at 15 1/s**. Take care that sample remains frozen.

Die Extraktion muss so durchgeführt werden, dass ein Auftauen der Proben bis zur Zugabe des Methanols verhindert wird. Ein Auftauen würde chemische Reaktionen erlauben, die die Metabolite verändern könnten. Das Metabolitenprofil soll aber den Zustand zum Zeitpunkt der Ernte widerspiegeln. Aus diesem Grund wird mit flüssigem Stickstoff gearbeitet (Verwendung von Handschuhen, Schutzbrille).

- 3) Add **300 µl 100 % Methanol** (100%), pre-cooled at -20°C, vortex. Most enzymatic activity stops.
- 4) Add **30 µl stock nonadecanoic acid methylester** (2 mg/ml Stock in CHCl₃) for quantitative internal standardization for the lipid phase.
- 5) Add **30 µl stock d4-succinat** (1mg/ml Stock in MeOH) as an internal quantitative standard for the tbs-derivatization.
- 6) Add **30 µl of a pre-mixture made from ribitol** (0,2 mg/ml Stock in 100% Methanol, used for quantitative internal standardization for the polar phase), **d4-alanine** (1mg/ml Stock in 100% water), **D-(-)-isoascorbic acid** (0,5 mg/ml Stock in 100% water), vortex.

Aus den Substanzen 3) bis 6) wird ein Premix hergestellt, um Pipettierfehler möglichst gering zu halten. (Zum Ausgleich von evtl. Volumenverlusten immer etwas mehr ansetzen).

- 7) Shake **15 min at 70°C**. After approx. 1 min of incubation, open the micro vials for a short moment and relieve built-up gas pressure. Let cool down to room temperature.
- 8) Add **200 µl CHCl₃**.
- 9) Shake **5 min at 37°C**.
- 10) Add **400 µl H₂O**, vortex.
- 11) Centrifuge **5 min at 14000 rpm**.

- 12) Transfer at least **three 80µl-aliquots** (*for potato tubers two additional 20µl-aliquots!*) from the upper polar phase and one **80µl-aliquot** for the lower phase (lipid phase) in fresh Eppendorfs.
- 13) Dry in the Speed Vac overnight, without heating. Small volumes (< 80 µl) may be dried within 2-3 h.

3.4.2. Derivatisation (second day)

Start in the morning, and prepare the sample list during the 1,5 h 30°C that the machine can be started at midday!

- 14) Process one replicate dried aliquot. Store the remaining dried aliquot of the polar phase under **argon**. Close caps of micro vials after gentle flushing with argon, better flood the Speed Vac with argon or nitrogen before opening. Put micro vials into a plastic bag add Silica Gel to the bag, flush with argon and heat seal the bag. These bags may be transported at room temperature but are best stored at –80°C. Surplus aliquots are used as back up samples in case of processing failures. Make sure that reference and treated samples are stored in the same bag. When processing bags from the freezer wait for temperature equilibration and remove moisture before opening the bag.
- 15) Add **40 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin)** to the dried aliquot.
- 16) Shake **1.5 h at 30°C** (incubation in a 28°C cabinet or room may be used).
- 17) Spin down shortly the drops on the snap cap.
- 18) Add **10 µl alkanemixture** to the polar phase.
- 19) Add **70 µl MSTFA**.
Optional for step 17-18: Make a premix from Alkanmix and MSTFA.

Aus den Substanzen 18) bis 19) wird ein Premix hergestellt.

- 20) Shake **30 min at 37°C** (incubation in a 37°C cabinet or room may be used).
- 21) Spin down shortly the drops on the cover.
- 22) Transfer 80µl into GC sample vials.

23) Also prepare vials with 110 μl MSTFA + 10 μl alkane mixture. These samples are used to pre-condition the GC-MS system.

Diese Vials dienen als wash. Sie enthalten keine Probe.

3.4.3. Measurement (second day)

1. Check machine: Tuning, Mass calibration, quick leak check, syringe (sometimes plugged), amount of wash buffer, liner
2. Prepare the sample list in the following order:
 - 1) Mstfa+Alkane (wash)
 - 2) Mstfa+Alkane (wash)
 - 3) Non-sample control (blank)
 - 4) Your samples in an appropriate order
3. After Starting of the machine check, if the machine is running. Check the chromatogram, peak shape, sensitivity, performance of alkanes, baseline, mass spectral properties.

Auswertung und Datentabellen werden im Internet nicht veröffentlicht.

